

10/031520

REC'D 07 AUG 2000

WIPO PCT

PCT/CN00/00205

证 明

25/

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 99 07 19

C N 0 0 / 0 0 2 0 5

申 请 号： 99 1 09881.1

七 丁 大 门

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 含藻蛋白多糖提取物的药物组合物以及藻蛋白
多糖的提取

发明人或设计人： 刘兆乾 丁 健 郭振泉 齐 清

请 人： 齐 清



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国

国家知识产权局局长

姜颖

2000年7月26日

99.07.19 P

权 利 要 求 书

1. 含藻蛋白多糖提取物的抗癌药物组合物，其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至 <7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

2. 根据权利要求 1 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

3. 根据权利要求 1 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

4. 根据权利要求 3 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

5. 根据权利要求 1 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

6. 根据权利要求 5 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

7. 根据权利要求 1 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

8. 含藻蛋白多糖提取物的改善血相组合物，其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，

99.07.19
5

- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

5

9. 根据权利要求 8 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

10

10. 根据权利要求 8 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

11. 根据权利要求 10 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻

粉的 10 倍。

12. 根据权利要求 8 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80℃-95℃。

15

13. 根据权利要求 12 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

14. 根据权利要求 8 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

20

15. 含藻蛋白多糖提取物的抗辐射剂，其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

25

16. 根据权利要求 15 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

30

99·07·19 ✓

17. 根据权利要求 15 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

5 18. 根据权利要求 17 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

10 19. 根据权利要求 15 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80℃ -95℃。

15 20. 根据权利要求 19 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

21. 根据权利要求 15 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

15 22. 含藻蛋白多糖提取物的修复 DNA 剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得：

20 a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，
d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

23. 根据权利要求 22 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

25 24. 根据权利要求 22 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

25. 根据权利要求 24 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

99-07-13

26. 根据权利要求 22 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80°C
-95°C。

27. 根据权利要求 26 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90°C。

5
28. 根据权利要求 22 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节
至 3.8-4.2。

10
29. 含藻蛋白多糖提取物的抗病毒剂，其中含有治疗有效量的藻
蛋白多糖提取物和/或的学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取
物依下列步骤获得：

15
a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
b. 于 60-100°C 下加热，冷却后固液分离，
c. 将液体的 pH 值调至 <7，再进行固液分离，
d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

30. 根据权利要求 29 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

20
31. 根据权利要求 29 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻
粉的 8-15 倍。

32. 根据权利要求 31 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻
粉的 10 倍。

25
33. 根据权利要求 29 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80°C
-95°C。

34. 根据权利要求 33 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90°C。

30
35. 根据权利要求 29 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节

2009-07-19

至 3.8-4.2。

36. 含藻蛋白多糖提取物的增免剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体，其中所述藻蛋白多糖提取物依下列步骤获得：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

10

37. 根据权利要求 36 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

38. 根据权利要求 37 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

15

39. 根据权利要求 38 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

20

40. 根据权利要求 36 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80℃
-95℃。

25

41. 根据权利要求 36 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

42. 根据权利要求 36 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节

至 3.8-4.2。

30

43. 藻蛋白多糖提取物的制备方法，其中包括步骤：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，

99-07-13 9

d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

44. 根据权利要求 43 的组合物，其中蓝绿藻选自螺旋藻。

5 45. 根据权利要求 43 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 8-15 倍。

46. 根据权利要求 45 的组合物，其中步骤 a 中的水的用量为干藻粉的 10 倍。

10 47. 根据权利要求 43 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 80℃ -95℃。

48. 根据权利要求 47 的组合物，其中步骤 b 中的加热温度为 90℃。

15 49. 根据权利要求 43 的组合物，其中步骤 c 中液体的 pH 值调节至 3.8-4.2。

99-07-19

10

说 明 书

含藻蛋白多糖提取物的药物组合物以及 藻蛋白多糖的提取

5

本发明领域

本发明涉及藻类生物体的提取物及其应用，特别是藻蛋白多糖的提取和应用。

10

本发明技术背景

七十年代以来，人们对藻类生物特别是蓝绿藻的研究日渐重视，起初，人们对藻类的研究主要集于其营养价值和毒性方面。在 1974 召开的联合国粮农组织会议上，螺旋藻就被认为是人类未来优秀食品资源。

15

然而对藻类生物的药物作用的认识则始于八十年代，人们主要集中研究各种藻类提取物的性能，在这些研究中，蓝绿藻类提取物，特别是螺旋藻的提取物的研究尤其引人注目。

20

在日本特许公开昭和 58-12832 中，报道了从小球藻及螺旋藻中提取的蛋白多糖具有抑制白血病癌细胞的功能，但此文件没有透露藻蛋白多糖的其它治疗效果和功能。

25

在此文献中，也公开了藻蛋白多糖的提取方法，由于没有细胞进行破壁，所以其仅为实验室方法，不能进行大规模的工业化生产。

本发明的发明人经过对藻蛋白多糖的提取和药用价值进行了大量研究，发现藻蛋白多糖具有多方面的治疗作用，由此提出本发明。

30

本发明公开

本发明的目的之一是提供一种含藻蛋白多糖提取物的抗癌组合物，其中含治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

5 本发明的另一目的是提供一种含藻蛋白多糖提取物的改善血相组合物，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

10 本发明的另一目的是提一种含藻蛋白多糖提取物的抗辐射剂，其中含有有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的修复 DNA 剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

15 本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的抗病毒剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

本发明的另一目的是提供含藻蛋白多糖提取物的增免剂，其中含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物和/或药物学上可接受的载体。

20 本发明的再一目的是提供藻蛋白多糖提取物的制备方法，其中包括步骤：

- a. 将蓝绿藻类干粉溶于 5-20 倍水中，进行细胞破壁处理，
- b. 于 60-100℃下加热，冷却后固液分离，
- c. 将液体的 pH 值调至<7，再进行固液分离，
- d. 将液体调节至中性，浓缩，必要时干燥。

附图的简要说明

图 1 是以本发明改善血相剂对小鼠进行的血相试验结果示图。

30 图 2 是本发明藻蛋白多糖提取物抑制 TODO I 介导的负超螺旋，

99.07.19

剂量组效果明显。

2. 改善造血功能、改善血相，提高血小板数值，

实验一、血相检验：

5 取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠，
以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉
德/分。

10 照射后的小鼠分为照射对照组、阳性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；阳性对照组喂食天津达仁堂制药厂生产的升血丸（放疗科常用的恢复血相药物），6000 mg/Kg/日（为成人服用量的 20 倍）；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。
15 各组分别于照射后第 1, 3, 6 天取小鼠尾血，按常规血相化验方法检测。

实验结果如下：（表内为白细胞总数 $\times 50^*$ ）

	第一天(n=10)	第三天(n=10)	第六天(n=7)
高剂量组	120±10.62(<0.01)	89.3±3.59(<0.01)	163.7±22.1(<0.01)
中剂量组	70.67.74(<0.3)	78.2±13.3(<0.05)	109.3±8.03(<0.02)
低剂量组	86.1±9.79(<0.05)	56.7±4.34(<0.3)	89.0±9.76(>0.5)
照射对照组	57.2±6.02	47.0±3.82	85.6±4.5
空白对照组	354.4±25.2	277.1±28.12	313.3±24054

20 细胞的测量数 \pm SE，总数 = 测量数 $\times 50$ ，括号内为与照射对照组相比的 P 值，n 为每个实验组的动物数

实验证明：给药组的白细胞数均比照射对照组高，且高剂量组的效果更明显 ($P<0.01$)，低剂量组的效果也超过阳性对照组，图示结果见图 1。

BR322 解释作用图谱。

图 3 是本发明藻蛋白多糖提取物对 TOPO II 介导的 RNA 去连环作用的影响的图谱。

图 4 为本发明藻蛋白多糖提取物诱导人 HL-60 白血病细胞凋亡的
5 琼脂糖凝胶电泳图。

图 5 是本发明藻蛋白多糖提取物的浓度与凋亡细胞百分数的关系
10 图。

图 6 是不同药物试剂对小鼠骨髓细胞状况的影响示图。

图 7 是小鼠骨髓 DNA 含量的测定结果。

图 8 是药物对小鼠 γ -球蛋白含量的效应。

图 9 是 T-淋巴细胞检验结果示图。

本发明详述

本发明提供了一种含藻蛋白多糖的提取物的药物组合物。在此组合物中，含有治疗有效量的藻蛋白多糖提取物，鉴于藻类生物没有任何毒副作用，因此本发明的藻蛋白多糖提取物没有进一步提纯，如需要，则可对提取物进行进一步的深加工，以获得较高的纯度。

本发明中所述的治疗有效量可根据具体情况而定，本领域普通技术人员根据实际所需药量可以很容易掌握，如可根据患者体重、年龄和病症情况确定。由于提取物都是无毒成分，所以根据需要，可以直接以提取物给药，此时药物组合物中则不含药物学上可接受的载体。当组合物中含有药物学上可接受载体时，它们可按制药领域常规方法混合而制备所需药剂。

所述药物上可接受的载体包括制药领域常规使用的那些，如溶剂，赋形剂，崩解剂等等，药物组合物可制成口服液，胶囊，冲剂，片剂，丸剂，粉剂，颗粒剂，糖浆，栓剂等常规制剂形式。

在本发明中，提取藻蛋白多糖的原料藻粉优选选用螺旋藻粉。步

2007.10

13

骤 a 中的破壁处理包括本领域常规使用方法，如超声处理等。

为除去藻粉表面培养物及杂质，可首先用少量水冲洗表面。通常状况下，步骤 b 中的加热时间为 0.5 到 2 小时为宜，优选加热 1 小时。
5 加热可在 60-100℃ 范围内进行，优选在 80°-95℃，最好在 90℃ 下进行。

用水量可使用藻粉量的 8-15 倍，优选是藻粉的 10 倍。

在步骤 c 中，首先将液体调节至酸性($\text{pH} < 7$)，但优选调节至 2.0-4.5，
10 最好将 pH 调节至 3.8-4.2。可用 HCl 或硫酸以及 Na_2CO_3 或 NaHCO_3 等常规酸碱试剂调节 pH。

在本发明方法中，所述的固液分离为本领域常规使用的那些分离方法，如减压抽滤，分子筛滤网过滤，离心分离等。由于本发明方法
15 中，对细胞进行了破壁处理，因而可得到较高产率的藻蛋白多糖提取物。

用本发明方法提取的藻蛋白多糖具有抗辐射，修复 DNA 损伤，提高造血机能，同时还可改善血相，抑制多种癌症。

20 以下结合以实施例对本发明作进一步说明。

藻蛋白多糖提取物的制备

实施例 1

25 将螺旋藻干粉 3kg 用 3 升冲洗，抽滤，向滤渣中加入 30 升水搅拌，在 88℃ 下加热 1 小时，冷却后，减压过滤分离，滤液用盐酸调节 pH 值至 3.8，放置过夜，离心分离，上清液用 Na_2CO_3 溶液调节 pH 至 3.8，然后喷雾干燥，得到藻蛋白多糖提取物粗品 0.599kg，经测定提取物中蛋白多糖含量为 72.3%。

30

99.07.19

c/s

实施例 2

将螺旋藻干粉 3kg 加入到 24 升水中，搅拌，在 90℃下加热 1 小时，冷却后，减压过滤，滤液用盐酸调节至 pH 为 4.2，放置过夜，过滤分离，滤液用 NaHCO₃ 溶液调节 pH 至 7。干燥得藻蛋白多糖粗品 0.549kg，经测定其中蛋白多糖含量为 71.2%。

5

生测试验

1. 抗辐射：

实验一、抗辐射实验

10

取自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠 150 只，120 只以 ⁶⁰Co-γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

15

照射后的小鼠每 30 只一组，分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；30 只未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。十日后，统计各组存活率如下：（以每组存活动物数表示）

20

组别	0	3	6	10	10 天存活率 (%)
高剂量组	30	30	26	22	73
中剂量组	30	30	26	19	63
低剂量组	30	30	26	10	33
照射对照组	30	6	6	3	10
空白对照组	30	30	30	30	100

实验表明，喂食藻蛋白多糖提取物的小鼠，存活率明显高于照射对照组，证明藻蛋白多糖提取物有显著的抗辐射损伤的作用，由此以中、高

99.07.19

16

实验二、海军某部进行一项强辐射环境下的工程，参与人员遭受不同程度的辐射损伤，经服用提供的藻蛋白多糖提取物，白血球数量回升，免疫力显著增强。使用单位证明，该产品具有较强的升白作用。

5

实验三、海军某部卫生队，对 30 例白血球、血小板数量偏低的人员进行实验，使用藻蛋白多糖提取物口服给药，每日两次，每次三片。一个月后，73%的人员白血球、血小板明显上升，饮食、睡眠、精神等方面均有明显改善，其余 26%的人员因本身白血球数量不偏低，故效果不显著，但仍保持在正常范围内。使用单位证明，该产品具有较强的升白作用。

10

实验四、血小板计数实验

15

参照卫生部颁发的《新药临床前研究指导汇编》的要求，观察藻蛋白多糖提取物对 $6.5\text{Gy}^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线不均匀照射比格狗的治疗作用。阳性观察药为中外合资郑州东方药业有限公司生产的升白口服液。实验结果表明：各观察组动物的外周血白细胞、粒细胞、红细胞、及血红蛋白和血细胞比容均无明显的差异。以藻蛋白多糖提取物制成的胶囊 360mg 于照射前 3 天开始口服，连续 24 天。治疗组动物外周血小板数于照射后第 2 和第 4 周明显高于对照组 ($P<0.01$)。对骨髓巨核细胞的恢复有一定的促进作用，骨髓切片中巨核细胞数也有所增加。治疗组动物外周血淋巴细胞转化率明显高于照射对照组和升白口服液治疗组。

20

25

以上结果表明：藻蛋白多糖提取物可以明显恢复照射后比格狗的外周血小板数和淋巴细胞转化率，促进骨髓巨核系造血祖细胞的增殖，可望作为大剂量放化疗的肿瘤病人及急性放射病病人血小板减少及免疫功能低下时的治疗药物。

30

3. 抑制多种肿瘤

99.07.19
12

藻蛋白多糖提取物在体外对人白血病细胞 U937、HL-60、P388 有明显的抑制其增殖的作用；对人肺癌 A49、人肝癌 HEP-G2 以及人胃肠道肿瘤 MKN-28、HCT116 细胞也有明显的抑制其增殖生长的作用。其在体外对小鼠 S180、B16 黑色素瘤，以及人胃癌、裸小鼠移植癌 MKN-28、SGC-7901 也有明显的生长抑制作用。

5

实验一、抑制多种肿瘤

体外实验所用肿瘤细胞株：

10

P-388	小鼠淋巴白血病
U-937	人大单核细胞白血病
HL-60	人淋巴母细胞性白血病
K-562	人红白血病
A-549	人非小细胞性肺癌
SPC-A4	人肺腺癌
DMS-114	人小细胞性肺癌
NCI-H23	人肺腺癌
SGC-7901	人胃中分化性腺癌
MKN-28	人胃高分化性腺癌
HCT-116	人结肠低分化性腺癌
Hep-G2	人肝细胞性肝癌
MCF-7	人乳房腺癌
A-431	人皮肤鳞癌。

15

20

以上细胞株均为本实验室保种及传代。

25

测定方法：P-388、U-937、HL-60 和 K-562 为悬浮肿瘤细胞株采用四氮唑盐还原法（MTT），按不同肿瘤生长速率，将一定数量处于对数生长期的肿瘤细胞 $90\mu l$ /孔接种于 96 孔微量培养板内，然后加入藻蛋白多糖提取物液 $10\mu l$ /孔，根据预实验结果，对每个细胞株，藻蛋白多糖提取物分别设五个浓度，每个浓度均为三个复孔。另设无细胞调零孔、相应药物浓度无细胞调零孔作为对照。肿瘤细胞在 $37^{\circ}C$ 、

30

2007.10/8

5%CO₂ 条件下培养 48 小时后，加 MTT(Sigma)液 20μl/孔；继续培养 4 小时后，加入三联液（10%SDS-5%异丁醇-0.01mol/lHCl）50μl/孔，于 CO₂ 培养箱中过夜。然后用酶标仪测 OD570 值。按下列公式计算被测物对癌细胞生长的抑制率，半数抑制量 IC50 值采用 Logit 法计算。

5

其余细胞株为贴壁肿瘤细胞，采用磺酰罗丹明 B 胍蛋白染色法 (SRB)，先贴壁 24 小时，培养方法同 MTT 法。肿瘤细胞贴壁 24 小时后，加入不同浓度的藻蛋白多糖提取物，作用时间为 72 小时。然后去培养液，用 10% 冷 TCA 固定细胞，4℃ 放置 1 小时后，用蒸馏水反复洗涤，空气中自然干燥。干燥后加入由冰醋酸配制的 SRB (Sigma) 溶液 100μl/孔，室温中染色 15 分钟，去上清液，用 1% 醋酸反复洗涤，空气中自干。最后加入 150μl/孔 Tris 溶液，用酶标仪测各孔的 OD570 值。抑制率和 IC50 的计算方法同 MTT 法。

10

15

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{\text{对照组OD值} - \text{治疗组 OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

表 1. 藻蛋白多糖提取物体外肿瘤对细胞增殖生长的抑制率(%)和 IC50 值

细胞株	浓度(mg/ml)	5	1.67	0.56	0.185	0.062	IC50(mg/ml)
P-388	90.7	72.1	31.4	5.8	1.2	1.03	
HL-60	95.7	63.8	25.5	17.0	0.0	1.22	
U-937	87.5	66.1	35.7	37.5	3.6	0.93	
MKN-28	76.2	55.4	24.8	20.8	14.9	1.29	
SGC-7901	48.3	6.2	2.1	3.4	0.0	----	
A-431	0.0	0.0	0.0	1.8	4.6	----	
SPC-A4	41.2	23.5	26.5	9.8	0.0	---	
	5	3.3	2.2	1.48	0.99		
	A-549	92.4	86.4	50.0	30.3	54.5	2.0

99-07-19

19

NCI-H23	30.9	10.3	0.0	4.4	0.0	---
DMS-114	75.0	63.5	46.2	36.5	19.2	2.36
Hep-G2	85.9	87.5	75.0	39.8	23.4	1.61
K562	85.1	73.1	41.8	29.9	19.4	2.18
MCF-7	0.0	6.3	20.8	1.7	0.0	----
HCT-116	86.1	65.7	44.4	30.6	24.1	2.15

实验二、藻蛋白多糖提取物对 DNA 拓扑异构酶活性抑制及对 DNA 的直接影响

真核生物的 DNA 的拓扑结构由两类关键酶即 I 类(topoisomerase I, TOPO I)和 II 类(topoisomerase II, TOPO II)拓扑异构酶调节。TOPO I 引起 DNA 单链断裂, 虽然不是真核细胞生存所必需, 但也在染色体组织、DNA 复制、转录过程中起重要作用。TOPO II 是细胞所必需的, 能够催化 DNA 的双链断裂, 在 DNA 复制、转录、重组中, 以及在形成正确的染色体结构、染色体分离、浓缩中发挥重要作用。由于 TOPO I 和 TOPO II 的细胞功能以及其催化特性, 成为临幊上相当广泛的化学治疗药品的靶。

具有 DNA 嵌合能力的 DNA 拓扑异构酶抑制剂可与 DNA 直接结合, 但并不能引起 DNA 断裂; 而另一类化合物可充当 DNA 分子剪, 直接切断 DNA。无论是拓扑异构酶抑制剂还是 DNA 分子剪, 它们最终作用对象都是 DNA, 使 DNA 代谢发生紊乱而导致细胞死亡。

实验方法:

1、藻蛋白多糖提取物对 TOPO I 活性的影响:

TOPO I 介导的负超螺旋 pBR322 解旋作用

2、藻蛋白多糖提取物对 TOPO II 活性的影响:

TOPOII 介导的 kDNA 去连环作用

实验结果见图 2 和图 3

99.07.19
20

1. 藻蛋白多糖提取物可抑制 TOPO I 介导的负超螺旋 pBR322 解旋作用。

在图 2 中, 沸道 1: pBR322 对照; 沸道 2: 1u TOPOI 酶粗提液; 沸道 3: 50 μ M 羟基喜树碱; 沸道 4—10: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分; 沸道 11-17: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的水溶性成分。

2. 藻蛋白多糖提取物对 TOPOII 介导的 kDNA 去连环作用的影响

在图 3 中, 沸道 1: kDNA 对照; 沸道 2 和 10: 1u TOPOII 酶粗提液; 沸道 3: 50 μ M VP16; 沸道 4—9, 11: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000, 10000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分; 沸道 12-17: 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2000 μ g/ml 藻蛋白多糖提取物的水溶性成分; 沸道 18: 20% DMSO。

实验结果表明,无论在 TOPO I 介导的超螺旋 pBR322 解旋的反应中, 还是在 TOPO II 介导的 kDNA 去连环的反应中, 藻蛋白多糖提取物的两种成分均能抑制 TOPO I 和 TOPO II 的活性, 但是二者抑制能力有较大差别。水溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 的抑制能力较强, 3.2 μ g/ml 和 16 μ g/ml 的剂量即分别完全抑制了 TOPO I 和 TOPO II 的活性, 而 DMSO 可溶性成分达到完全抑制效应的剂量分别为 80 μ g/ml(TOPO I)和 2000 μ g/ml(TOPO II)。

这些现象表明, 水溶性成分是藻蛋白多糖提取物抑制 TOPO 酶的主要活性成分, 其作用机理可能是首先与 DNA 相互作用, 导致 DNA 构象的改变, 使酶不能与底物有效接触, 酶活力下降乃至为零。藻蛋白多糖提取物的 DMSO 可溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 也有不同程度的抑制, 有可能该成分作用靶点为酶, 直接与酶作用而导致酶的催化活力下降。

99-07-19 21

综上所述，藻蛋白多糖提取物的水溶性和 DMSO 可溶性成分对 TOPO I 和 TOPO II 都有较为明显的抑制作用，水溶性成分还可直接引起 DNA 双链断裂。

5

实验三、藻蛋白多糖提取物对蛋白酪氨酸激酶 (TPK) 的作用

10

蛋白酪氨酸激酶 (tyrosine protein kinases, TPK) 是信号传递过程中的关键因子，与细胞生长、增殖、转化密切相关。许多癌基因的表达产物都具有 TPK 活性，很多恶性转化细胞中的 TPK 活性远远高于正常细胞。所以若能降低 TPK 的活性就可能阻断肿瘤细胞的失控生长。

15

表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是一种受体型 TPK，它是由 1186 个氨基酸组成的单链跨膜糖蛋白，分子量为 17000 道尔顿，广泛分布于哺乳动物的上皮细胞膜上。磷酸化后 EGFR 受体 C 末端可识别和激活胞内多种底物酶，通过一系列反应影响细胞的代谢、生长和癌变。研究表明 EGFR 在许多肿瘤中异常表达，并与肿瘤的转移和预后有密切的关系。本实验选择富含 EGFR 的 A431 细胞提取 TPK，观察藻蛋白多糖提取物对 TPK 磷酸化活力的影响。

20

实验结果：

实验结果 1：

藻蛋白多糖 提取物浓度 (mg/ml)	5.0	2.5	1.2	0.6	0.3
抑制率 (%)	100	100	100	67.9	65.0

阳性对照：2.5mM tyrphostin 25，抑制率 100%

99-07-19

实验结果 2:

藻蛋白多糖	1.5	0.75	0.4	0.2	0.1
提取物 浓度					
(mg/ml)					

抑制率 (%) 94.1 72.5 62.7 62.7 47.1

阳性对照: 0.25mM 的 tyrphostin 25, 抑制率 86.1%

实验结果 3:

藻蛋白多糖	1.2	0.6	0.3	0.15	0.07
提取物 浓度					
(mg/ml)					

抑制率 (%) 89 80.6 67.7 54.1 37.7

阳性对照: 0.25mM 的 tyrphostin 25, 抑制率 80.5%

5

结论和讨论

实验结果表明藻蛋白多糖提取物能明显抑制 TPK 的活性, 浓度高于 1.2mg/ml 时几乎完全抑制了 TPK 的酪氨酸磷酸化, 在 0.3mg/ml 时对 TPK 的抑制在 65—67% 左右; 继续降低藻蛋白多糖提取物的浓度到 0.07mg/ml 时对 TPK 活性仍有 37.7% 的抑制。

10

以上实验证明了藻蛋白多糖提取物能明显抑制 TPK 上酪氨酸残基的磷酸化。它可能正是通过对酶的抑制从而阻断由 TPK 介导的信号传导通路, 达到遏制肿瘤细胞的恶性生长, 从而发挥其抗肿瘤作用。至于其作用方式是减少了 EGFR 的表达, 还是抑制了 EGF 与受体的结合, 还有待于进一步研究。

15

实验四、藻蛋白多糖提取物诱导人 HL-60 白血病细胞的凋亡

20

凋亡是细胞在基因调控下的一种主动死亡, 其调节功能的紊乱与恶性肿瘤的发生密切相关。已知多种抗癌药物可引起肿瘤细胞的凋亡, 且抗癌疗效与其诱导肿瘤细胞凋亡的能力有关。诱导细胞凋亡可

99-07-13
23

能是不同机制抗癌药物发挥作用的共同通路，所以细胞凋亡成为评估疗效的一项新指标，诱导肿瘤细胞凋亡也成为一个新的抗肿瘤作用靶点。

5 实验方法与结果

琼脂糖凝胶电泳

当细胞发生凋亡时，核酸内切酶激活，DNA 在核小体间断裂，

10 形成 180—200bp 整倍数的 DNA 片断，琼脂糖凝胶电泳能检测到特征性的梯形条带，试验结果见图 4。图 4 中，1 为对照，2 为藻蛋白多糖提取物 1mg/ml，3 为藻蛋白多糖提取物 3mg/ml，4 为藻蛋白多糖提取物 6mg/ml。

流式细胞术

15 细胞凋亡时，断裂的 DNA 小片断逸出细胞，使细胞内 DNA 含量下降，流式细胞仪就能检测到在细胞增殖 G1 期之前，有一群低于二倍体 DNA 含量的亚 G1 期细胞，即凋亡状态细胞，试验结果见图 5。

20 以上实验证明，藻蛋白多糖提取物对体内外多种白血病及实体肿瘤均具有明显的抑制作用。其机理是藻蛋白多糖对肿瘤细胞内的酶及 DNA 的作用。

4. 修复 DNA

实验一、骨髓损伤实验

25 取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的、C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

99-07-19

24

组别	细胞数/50mm ² (平均数)	未成熟细胞占比例 (平均数)	细胞分裂相
空白对照组	140	40	有
照射对照组	31	4	无
低剂量组	72	30	有
高剂量组	74	35	有
阳性对照组	45	35	有

5 照射后的小鼠分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。在照射后的第二天，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取材做组织切片。用显微镜观察，在放大 750 倍下计数。

10 实验结果见图 6，表明：

照射对小鼠骨髓有明显的损伤以照射对照组最为显著，其骨髓呈空网状，单位面积细胞数量明显减少，细胞发育中断，年幼细胞仅占 4% 左右，未见细胞分裂相。骨髓中毛细血管壁受损，引起出血，形成“血池”。而给药组则受损明显减轻。

15 实验二、骨髓 DNA 含量测定

照射及给药同上。在照射后的第六天，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取一侧完整股骨，除净软组织，用 0.005McaCl₂ 10ml 将全部骨髓冲入离心管中，置 4℃ 冰箱 30 分钟，2500 转/分离心 15 分钟，沉淀物加 0.2MHClO₄ 5ml 充分混合，90℃ 加热 15 分钟，冷却后离心，上清液在 286nm 处测定紫外吸收 OD 值。DNA 含量计算：O.D. 值按 $1.0=33 \mu \text{g/mlDNA}$ 。

2007.19

25

实验结果如下：

组别	空白对照组	照射对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组	阳性对照组
DNA 含量 μg/ml	49.04	2.01	2.71	8.94	6.34	3.56
	27.03	2.94	8.42	10.00	4.82	2.38
	27.92	1.58	7.19	7.79	6.14	4.79
	27.19		4.42		3.70	6.34
平均值	32.79	2.18	5.68	8.91	5.25	4.27
P			<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

图示结果见图 7，表明：各给药组的 DNA 测定值均高于照射对照组。经统计给药中剂量组、高剂量组及阳性对照组与照射对照组相比均有显著差异 ($P<0.01$)。说明药物对骨髓细胞有较好的保护作用，对 DNA 有明显的修复作用。

5. 抗病毒

临床病理：

患者 1. 王殿来，中年男性，北京大兴县农民。早先患病毒性肝炎，后发展为肝硬化，10 余年，并发严重腹水、消化道大出血，经医生诊断，存活希望不大。后服用藻蛋白多糖提取物，每日两次，每次一粒，连续 60 天，腹水明显减轻，未再发生大出血，至服药 90 天时，腹水基本消失，至服药 180 天时，不仅生活自理，而且恢复正常工作，身体无不适感，精力充沛。99 年在 301 医院做 CT 检查，并与 10 年前 CT 比较，病灶未继续扩大或恶化。病理学家认为，肝硬化 10 年后，未见恶化迹象，实属罕见。

患者 2. 张久旺 北京大兴县小学校长。因患病毒性肝炎，治疗不力，后发展为肝硬化，并发严重腹水、消化道大出血，生命垂危。后服用藻蛋白多糖提取物，每日两次，每次一粒，连续 60 天，腹水明显减轻，未再发生大出血，至服药 90 天时，腹水基本消失，至服药 180 天时，不仅生活自理，而且恢复正常工作，身体无不适感，精

99-07-19
~6

力充沛。99 年在 301 医院做 CT 检查，未发现病灶。病理学家认为，有理由认定病毒已被抑制。

6. 修复黏膜损伤：

5 取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的 C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

10 照射后的小鼠分为照射对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组；未经照射的小鼠为空白对照组。空白组与照射对照组不喂药；低剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 10mg/Kg/日；中剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 20mg/Kg/日；高剂量组喂食藻蛋白多糖提取物 40mg/Kg/日。在照射后的第七和第十四日，各组分别随机取 10 只小鼠进行解剖，取小肠做组织切片。用显微镜观察，计量并拍照。实验表明：

15 照射对小肠黏膜上皮细胞有明显的损伤，小肠黏膜顶部的黏膜上皮细胞出现破损，在受损伤严重的部位并发细胞脱落，造成绒毛顶部却黏膜上皮细胞覆盖，固有膜裸露。但给药组的小肠黏膜上皮损伤程度与对照组相比较有明显的降低（好转）。

20 7. 增强免疫力：

实验一、 γ -球蛋白百分含量

取购自中国医科大学动物中心的、体重 18-22 克的、C-57 小鼠，以 ^{60}Co - γ 射线进行全身照射，辐照剂量 600 拉德，计量率为 8.64 拉德/分。

25 照射后的小鼠分为照射对照组、照射给药组；未经照射的小鼠为空白对照组、空白给药组。自小鼠眼眶取血，离心，取血清用微量加样器点样，染色后做色谱分析，根据各色带的吸收峰值计算在血清球蛋白中 γ -球蛋白相对含量。

99·07·19

27

实验结果如下：

组别	平均 γ -球蛋白相对百分含量($\pm SD$)
空白对照	10.07 \pm 3.57
空白对照	12.84 \pm 6.75
照射对照	6.19 \pm 4.96
照射给药	13.32 \pm 6.73

图示结果见图 8，表明：无论照射组还是非照射组，给药组的 γ -球蛋白含量都高于相应的对照组，且照射给药组基本上平行于非照射给药组。由于 γ -球蛋白可以代表机体的免疫功能，所以 γ -球蛋白相对含量的提高，可以说明机体免疫能力的提高。

实验二、T-淋巴细胞检验

取体重 18-22 克的小鼠，随机分为四组，每组 10 只。实验组每日每只腹腔注射环磷酰胺 10 mg/Kg，再经口灌胃“藻蛋白多糖提取物”药液，剂量如前；阳性对照组每日每只腹腔注射环磷酰胺 10 mg/Kg，再经口灌胃常水；空白对照组不注射环磷酰胺 10 mg/Kg，只经口灌胃常水；连续给药 10 天，停药 2 天，取眼眶血做白细胞推片、孵育、染色后，测定 T-淋巴细胞百分率。

实验结果如下：

组 别	T 淋巴细胞百分率	P 值
空白对照	28.0 \pm 2.55	
阳性对照	25.6 \pm 2.51	
高剂量	39.8 \pm 7.40	<0.01
低剂量	33.2 \pm 6.30	<0.05

图示结果见图 9，表明：

注射环磷酰胺后，造成小鼠 T-淋巴细胞明显下降，但给药组则呈明显升高，尤其是高剂量组，其 P 值小于 0.01，说明藻蛋白多糖提取物确有提高机体免疫功能和保护骨髓细胞的作用。

99·07·19
8

说 明 书 附 图

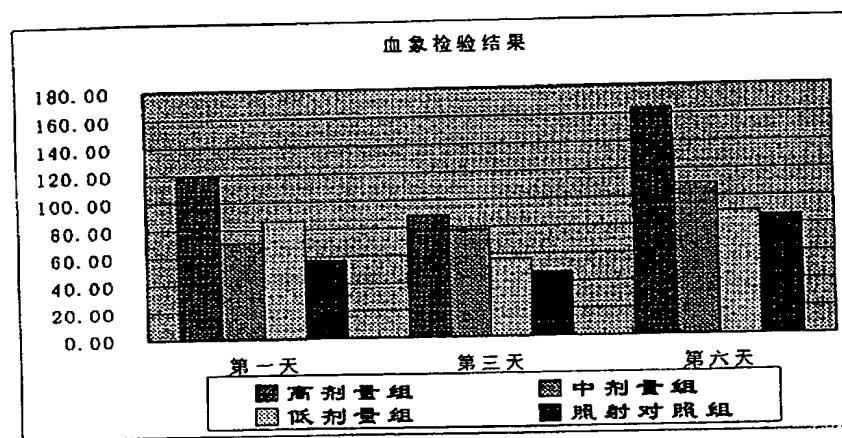


图 1

99-07-19
29

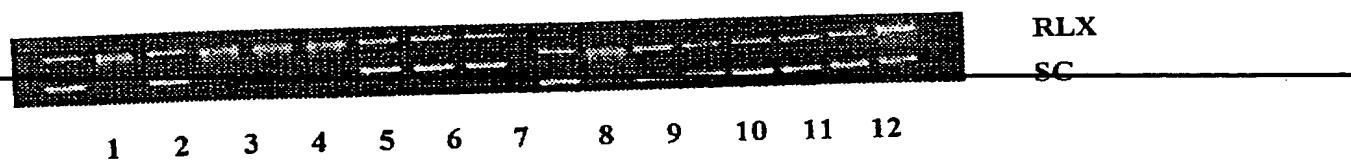


图 2

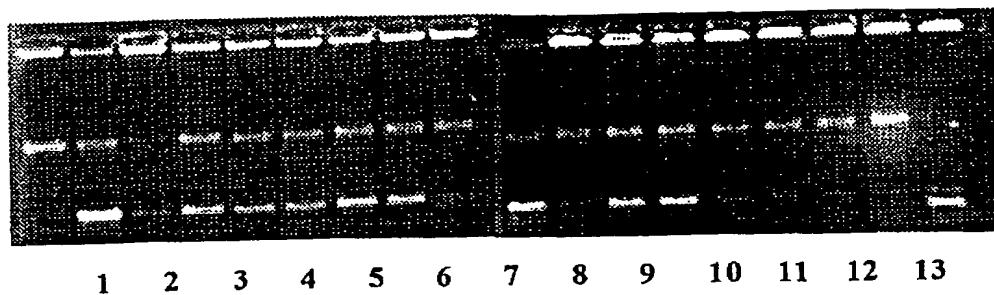


图 3

99-07-19

30



图 4

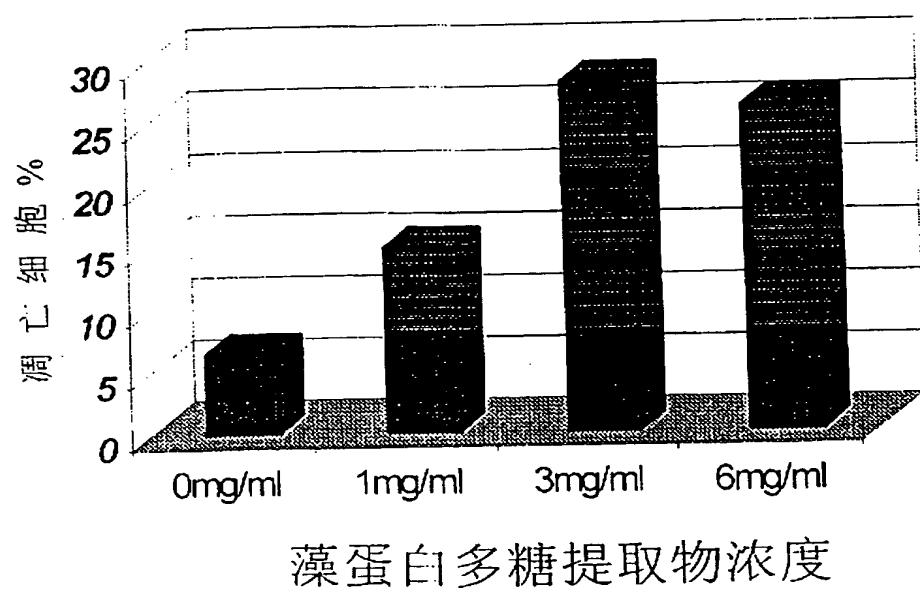


图 5

99·07·19

31

不同药物剂量对骨髓细胞状况的影响

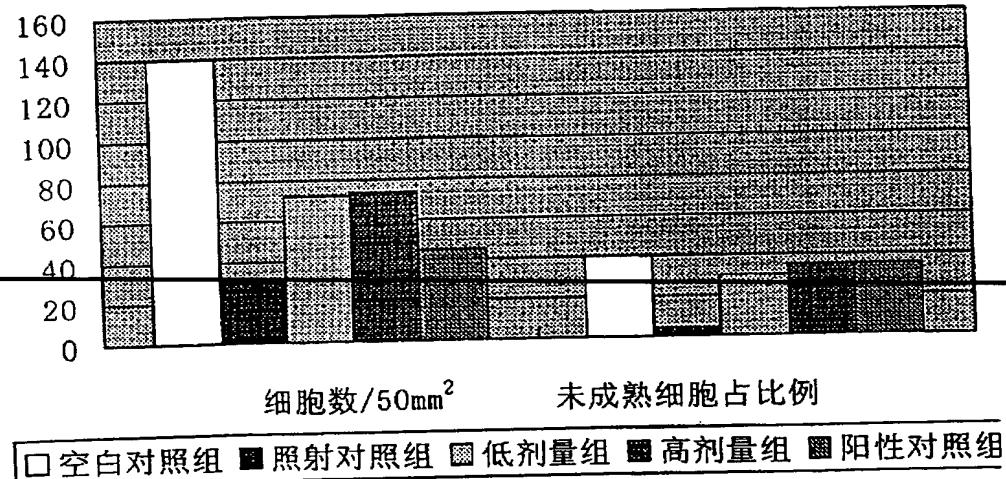


图 6

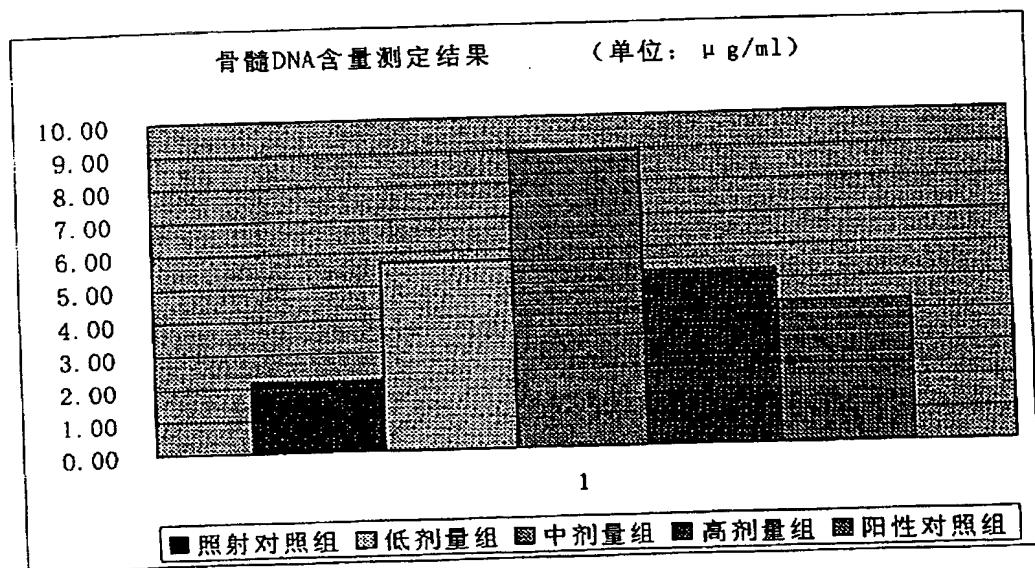


图 7

99-07-19
3

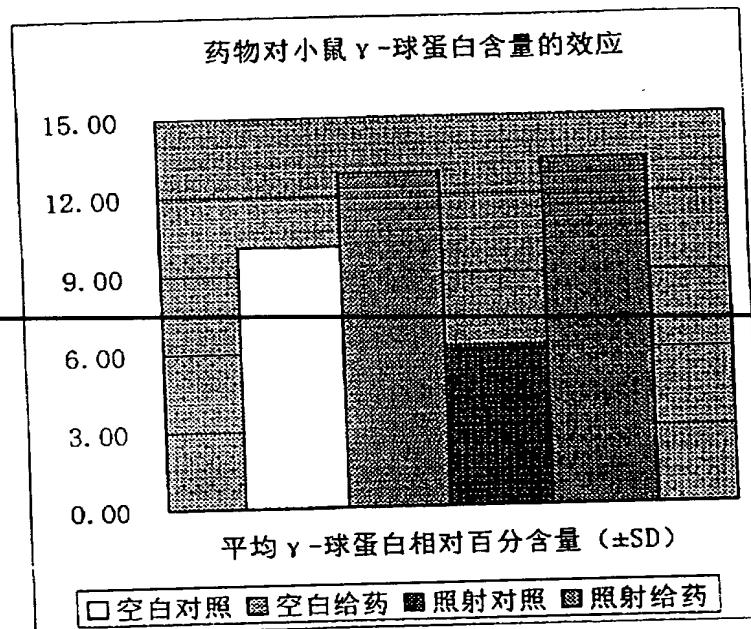


图 8

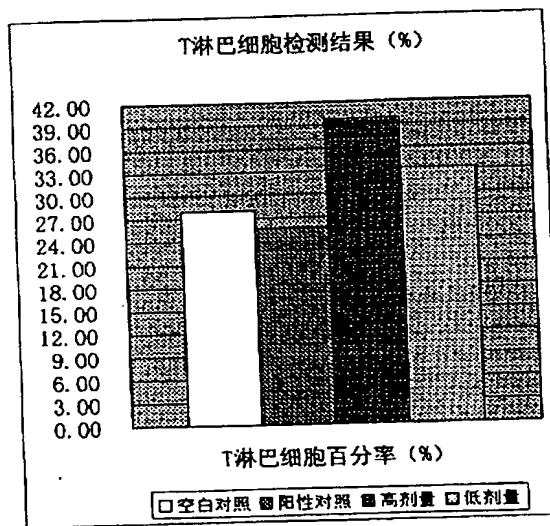


图 9